

Dialog Search: English Abstract for Japanese Patent:

File 351:Derwent WPI 1963-2001/UD,UM &UP=200145
(c) 2001 Derwent Info Ltd

?e pn=jp 6319535

S1 1 PN="JP 6319535"

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010139059 **Image available**

WPI Acc No: 1995-040310/199506

XRAM Acc No: C95-017726

Established hepatocytes having higher drug-metabolising activity compared to normal hepatocytes - are prepd. by fusing sub-culture propagative hepatocyte strain with hepatic parenchymal cells

Patent Assignee: BIOMATERIAL KENKYUSHO KK (BIOM-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP06319535	A	19941122	91JP-0106539	A	19910412	199506 B

Priority Applications (No Type Date): 91JP-0106539 A 19910412

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP06319535	A	5	C12N-005/18	

Abstract (Basic): JP 6319535 A

New established hepatocytes propagative by subculture have higher drug-metabolising activity. The established hepatocytes are obtd. by fusing subculture - propagative hepatocytes strain with hepatic parenchymal cells obtd. from living body. The hepatocytes strain is opt. known hepatocytes strain.

Alternatively, the established hepatocyte are opt. prepd. by fusing cell membrane with polyethylene glycol; fusing cell membrane with Sendai virus or fusing cell membrane by breaking down a part of cell membrane with electric pulse.

USE - The hepatocytes have drug-metabolising activity of higher level near to level of normal hepatocytes. Useful in drug-metabolising test, toxicity test and carcinogenicity test by means of hepatocytes. Also, useful as substitute method for animal experiment or primary screening method prior to animal experiment in the field of carcinogenicity test.

Dwg.0/3

Title Terms: ESTABLISH; HIGH; DRUG; METABOLISM; ACTIVE; COMPARE; NORMAL; PREPARATION; FUSE; SUB; CULTURE; HEPATO; STRAIN; HEPATO; PARENCHYMA; CELL
Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-005/18

International Patent Class (Additional): C12N-015/06

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F02; D05-H10

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M903 P831 Q233 V754

ESTABLISHED HEPATIC CELL

Patent Number: JP6319535
Publication date: 1994-11-22
Inventor(s): TAKASHINA MAKOTO; others: 01
Applicant(s):: BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK
Requested Patent: ☐ JP6319535
Application Number: JP19910106539 19910412
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N5/18 ; C12N15/06
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To obtain novel hepatocyte useful for medicinal metabolism tests or toxicity and carcinogenicity evaluation tests.

CONSTITUTION:The established subculturable hepatic cell is obtained by fusing a subculturable hepatic cell strain to a hepatocyte collected from a living body and has a high medicinal metabolic activity. This hepatic cell is prepared by, e.g. the cell fusion of a normal hepatic cell of a rat to a hepatic cell strain derived from an existing rat hepatic cancer. Furthermore, the hepatic cell is obtained by a method for fusing the cell membrane with PEG or a Sendai virus or destroying a part of the cell membrane with electric pulses, then fusing the cell membrane, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

U.S. Serial No.: 09/881,526
Docket No.: 441472000500

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-319535

(43) 公開日 平成6年(1994)11月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/18 15/06		8412-4B 9050-4B	C 1 2 N 5/ 00 15/ 00	B B

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平3-106539

(22) 出願日 平成3年(1991)4月12日

(71) 出願人 591082269

株式会社バイオマテリアル研究所
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(72) 発明者 株式会社バイオマテリアル研究所内 高階
誠

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(72) 発明者 株式会社バイオマテリアル研究所内 新原
直樹

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(74) 代理人 弁理士 須藤 政彦 (外1名)

(54) 【発明の名称】 株化肝細胞

(57) 【要約】

【構成】 継代培養の可能な肝細胞株と生体より採取した肝実質細胞を融合することにより得られた高い薬物代謝活性を有することを特徴とする株化肝細胞。肝細胞株として、薬剤を用いて人為的にもしくは自然に発症した肝癌組織あるいは胎児肝から分離した細胞株等を使用する。

【効果】 薬物代謝試験や毒性、発癌性試験等の分野で動物実験の代替方法等として利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 継代培養の可能な肝細胞株と生体より採取した肝実質細胞を融合することにより得られた高い薬物代謝活性を有することを特徴とする継代培養可能な株化肝細胞。

【請求項2】 肝細胞株が、既存の肝細胞株である請求項1記載の株化肝細胞

【請求項3】 ポリエチレングリコールで細胞膜を融合させる方法、センダイウイルスで細胞膜を融合させる方法もしくは電気パルスで細胞膜の一部を破壊して細胞膜を融合させる方法のいずれかを用いて作製した請求項1記載の株化肝細胞。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明は、正常肝細胞に近い高レベルの薬物代謝活性を有し、かつ継代培養の可能な新規株化肝細胞に関するものであり、肝細胞を用いた薬物代謝試験や毒性および発癌性評価試験に利用することができる。

【0002】

【従来の技術】 肝細胞は、多数の酵素を合成し、多くの物質代謝を行う臓器細胞であり、特に自然界に存在しない合成物質に対しても代謝を行なうため、その代謝作用は薬物の薬効、安定性や摂取物質の毒性、発癌性に関係することが知られている。薬物を含めた化学物質の人体に与える影響を調べるには、一般にラット等を用いた動物実験が行なわれているが、動物の飼育に多くの手間とコストを要する他に、飼育状態の違いによるデータの再現性の悪さが問題であった。さらに動物愛護の観点からも、近年では培養細胞を用いた評価試験方法が検討され始めている（日本動物実験代替法学会 第4回要旨集 1990年）。その場合、生体内では上記の如く摂取された化学物質は肝細胞により異なる物質に変化するため、その反応を進めるために肝臓の抽出液を加える方法が一般に用いられている。従来の肝臓抽出液を加える方法は、肝細胞内の酵素を取り出して用いるためその反応性は低く、又、反応条件が細胞内とは異なるため必ずしも生体内の反応を再現しているとは云い難い。

【0003】 又、抽出液を採取する肝臓の状態、抽出条件等の違いによる反応性の違いや肝臓の供給源が生体であるためコストがかかる等の問題があった。正常肝細胞もしくは増殖可能な肝細胞株の培養系に化学物質を添加し、その代謝を調べることにより細胞内の反応を生体外で調べることが有効と思われるが、生体から取り出した肝細胞は短期間でその機能を失うことが知られている。近年、基底膜成分を再構成したマトリゲル（J. Cell Physiol. 134, 309-323, 1988）やコラーゲンゲル（特願平1-13762号）を培養基質として用いる方法で肝細胞を長期間機能を失わずに培養することが可能になったが、抽出液を用いる方法

と同様、肝細胞を採取する個体の状態、採取条件の違いによりデータがばらつく点、及び細胞の供給源が生体であるため有限であり手間及びコストがかかる点は解消されない。

【0004】 生体外で継代培養が可能で、しかも生体成分由来のゲルを用いるという面倒な方法を用いずに培養できる形質の安定した肝細胞株を用いることができれば、上記のデータのばらつきや細胞の供給源、コスト等の問題を解決できる。しかしながら、これ迄に樹立された肝細胞株はすべて増殖しやすい癌組織や胎児肝から分離したもの、もしくはウイルスや癌関連遺伝子を肝細胞に導入したものであり、生体外での増殖性を獲得するかわりに、肝機能の多くは失われている。薬剤代謝能についても、大部分の肝細胞株はその機能を喪失しており、その機能を保持している肝細胞株でも活性値は低い。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、以下の1～3の技術的手段から構成される。

(1) 継代培養の可能な肝細胞株と生体より採取した肝実質細胞を融合することにより得られた高い薬物代謝活性を有することを特徴とする継代培養可能な株化肝細胞。

(2) 肝細胞株が、既存の肝細胞株である請求項1記載の株化肝細胞ないし4項記載の株化肝細胞。

(3) ポリエチレングリコールで細胞膜を融合させる方法、センダイウイルスで細胞膜を融合させる方法もしくは電気パルスで細胞膜の一部を破壊して細胞膜を融合させる方法のいずれかを用いて作製した請求項1記載の株化肝細胞。

【0006】 本発明は、上記の如く既存の肝細胞株は薬剤代謝能等の肝機能が低いか失われているという問題点を解決するためのもので、細胞融合法を用いることにより、高度の肝機能を持つ新規の株化肝細胞を提供するのである。既存の肝細胞株化方法では肝機能に関連する遺伝子が存在する染色体の脱落や異常が起こりやすく、さらに遺伝子が正常でも蛋白質の修飾や細胞質の状態の異常等により、肝機能は正常に発現されなくなるため、正常な肝機能を保持している肝細胞株を得られる確率は極めて低い。そこでモノクローナル抗体を産生するB細胞ハイブリドーマを得るために一般的に用いられている正常細胞と株細胞を融合する細胞融合法は増殖能を持つ株細胞に正常細胞が持つ特異的な機能を賦与するのに有効な方法であると考え、この細胞融合法を肝細胞に適用することにより、本発明を完成するに至った。即ち、B細胞ハイブリマードの例に見られる様に細胞融合法は、一旦失われたか弱められた組織特異的な機能を再び増殖可能な株細胞に賦与できる方法であり、さらに細胞質の形態も正常に近づけることが可能なため、正常な肝機能を保持している細胞株を得られる確立が高い。又、正常細胞と細胞株の融合細胞株を再び正常細胞と融合するこ

とにより、より正常細胞に近い機能を持つ融合細胞株を得ることが可能となる。なお、これ迄に試みられている肝細胞を用いた細胞融合の例は、肝細胞株と繊維芽細胞等の他種細胞株を融合し融合細胞の機能と染色体を調べることにより、遺伝子の染色体上の位置を調べる等の限られた肝機能のみを持つ細胞を作り出すための方法として利用されたものであり、本発明の如く肝機能を高めるために肝細胞株と正常肝細胞を融合させた例は皆無である。

【0007】本発明で細胞融合に用いる肝実質細胞はあらゆる動物種から下記の2つの方法のいずれかで採取することができる。

肝実質細胞採取方法1：主として市販されているマウス、ラット等の小型実験動物から肝実質細胞を入手する方法で、門脈血管にチューブに接続したカニキュレもしくは注射針を差し込み、下大静脈を切開した後、チューブより灌流液（生理濃度の食塩水を含む中性緩衝液）を肝臓内に連続注入する。肝臓内に灌流した灌流液は肝臓内の血液を洗い流して下大静脈切開部より排出される。十分に肝臓内の血液を脱血後、コラゲナーゼを含む灌流液を同様の操作で肝臓内に灌流させ、肝臓内のコラーゲンを消化させる。その後、肝臓を切出し、培養液中で細片化すると単離肝細胞が遊離してくるので、メツシユを通して細胞塊及び細胞外組織を取り除く。メツシユ通過液中には単離肝実質細胞と、単離肝非実質細胞が含まれているが、その大きさが異なるため低速遠心操作もしくは密度勾配遠心操作により肝実質細胞のみを分離できる。但し、肝非実質細胞を含んだ細胞集団を用いて細胞融合を行っても、融合細胞の形態観察、アルブミン分泌等の機能分析により肝実質細胞の融合細胞のみを選別できるため、最後の分離操作は省略しても良い。肝実質細胞採取方法2：採取方法1よりは収率が劣るがあらゆる動物種に適用できる方法で酵素により細胞間物質を取り除く点は、採取方法1と同様である。生体中より肝臓の一部もしくは全部を取り出した後、切断面の脈管より注射器で灌流液を注入し脱血させる。次にコラゲナーゼ及びデイスパーゼを含む灌流液を切断面の脈管より注入した後、肝臓を細片化し、その組織をコラゲナーゼ及びデイスパーゼを含む灌流液に浸漬し37℃の条件下で30分程度振盪する。単離細胞は灌流液中に遊離してくるので以後の細胞ろ過及び肝実質細胞の分離の操作は採取方法1と同様に行う。

【0008】また、細胞融合に用いる肝細胞株は、ATCC (American Type Culture Collection) や理化学研究所ジーンバンク等の細胞保存機関から既存の肝細胞株を入手できるが、下記の既存の肝細胞株樹立方法を用いて作製しても良い。即ち、自然発症もしくは発癌性物質の投与により癌化した肝臓組織あるいは増殖性の活発な胎児の肝臓より採取した組織切片を細胞外物質もしくは細胞間接着蛋白質を消

化するためのコラゲナーゼ、デイスパーゼ、トリプシン等の酵素を単独もしくは並用して処理することにより細胞を分散させるか、あるいは微小な細片に切りきざんだ後、培養シャーレに撒き、増殖してきたコロニーをクローニングして得られた肝細胞株か、肝実質細胞入手方法で得た新鮮な肝実質細胞に細胞に増殖性を与えるシミアンウイルス40 (SV40) のT抗原遺伝子や同様な作用を持つアデノウイルスのE1遺伝子等のウイルス遺伝子、あるいは同様な作用を持つc-myc等の癌関連遺伝子を磷酸カルシウム法や電気パルス法、ウイルス感染法等の動物細胞内へ外部遺伝子を導入する方法を用いて導入し安定した増殖性を獲得した肝細胞株を用いても良い。

【0009】細胞融合の方法は、細胞同志が接触した状態で細胞膜の一部を融合させることにより、細胞質及び細胞核も融合させることができる。既知の細胞融合方法として、ポリエチレングリコール溶液を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気パルスを用いる方法等があるが、そのいずれを用いても良い。

【0010】

【作用】本発明の正常肝細胞と肝細胞株を融合することにより得られた新規な株化肝細胞は、形態学的に見て、既存の肝細胞株が正常細胞と比べて形が小さいか、不揃いであるのに対し、正常細胞に近い形態であつた。さらに、尿素合成能やチロシンアミノ代謝酵素活性等の肝臓特異的な機能を良く保持していたが、特に薬剤代謝酵素であるチトクロームP450の活性は正常細胞に近い高レベルを保持していた。具体的な細胞融合方法及び新規株化肝細胞の性質について以下の実施例で説明する。

【0011】

【実施例】ラットの正常肝細胞と既存のラット肝癌由来肝細胞株の細胞融合により得られた高い薬剤代謝能を持つ新規株化肝細胞の例を以下に示すが、用いる肝細胞の動物種、肝細胞株の種類、細胞融合の方法は下記の実施例により限定されるものではない。

【0012】材料の調整

1. 正常肝細胞は、Wistarラット、雄、6週令を麻酔により眠らせた後、開腹し、門脈よりコラゲナーゼ溶液を灌流の後、肝臓を取り出しメスで細片にし細胞を単離する方法で得た。さらに低速遠心で非実質細胞を除いた。
2. 既存の肝細胞株はラット肝癌細胞株H4IIE細胞(ATCC CRL1548)から派生したヒボキサンチンホスホオリボシルトランスフェラーゼ欠損株であるH4TG細胞(ATCC CRL1578)を、6-チオグアニン添加培養液で2週間培養してから用いた。なお、肝細胞株として、薬剤を用いて人為的に、もしくは自然に発症した肝臓組織あるいは胎児肝から分離した細胞株、あるいは、シミアンウイルス40 (SV40) や、アデノウイルス等の細胞増殖作用をもつことが知られているウイルスの細胞増殖作用を持つ部分の遺伝子も

しくはc-myc等の細胞増殖作用を持つ癌関連遺伝子を正常な肝実質細胞に導入することにより得られた細胞株、を用いることも可能である。

【0013】細胞融合

1. トリプシン-EDTA溶液を用いて培養シャーレからはがしたH4TG細胞と、ラット肝から単離した肝細胞をそれぞれ培養液で洗浄した後、培養液中で正常細胞／肝細胞株＝1／1の細胞数比率で混合し、50ml遠沈管に入れて遠心し、上清を除いた。
2. ポリエチレングリコール2gをオートクレーブで溶解させた液にダルベッコ変法イーグル培地（DME）2.5mlを加えた溶液1mlを細胞融合液として用いた。
3. 1. で準備した細胞集塊に37℃の温浴条件下で2. の細胞融合液をピペットでゆつくりと加えると同時にピペット先端で細胞集塊をくずし、さらにDME10mlを加えた。
4. 3. で融合された細胞をDMEで洗浄した後、10cm径シャーレに播種した。なお、細胞融合方法として、センダイウイルスで細胞膜を融合させる方法、電気パルスで細胞膜の一部を破壊して細胞膜を融合させる方法を用いた場合も、同様の結果が得られた。

【0014】細胞選別

1. H4TG細胞が生存できないHAT（ヒポキサンチン アミノプテリン チミジン）添加10%牛胎児血清入培地で融合細胞を培養し、H4TG細胞と正常肝細胞の融合細胞のみのコロニーを得た。
2. コロニーをセルスクレイパーではがした後、トリプシン EDTA溶液中で細胞を分散させて12ウエルプレートに播種した。
3. 2. と同様の操作を繰り返すことにより、形質の安定した株化肝細胞を樹立した。

【0015】薬剤代謝能評価

得られた新規株化肝細胞は、正常肝細胞と同様に、3-メチルコラントレン刺激により薬剤代謝（酸化還元）酵素であるチトクロームP450c/dのメツセンジャーRNAの強発現が見られ、さらに図1に示す様に細胞抽出液及び図2に示す様に培養細胞そのものが正常肝細胞の代謝試験に用いられる代表物質である7-エトキシマリンを7-ヒドロキシマリンに代謝する能力を有していた。一方、図3に示す様に親株であるH4TG細胞や他の肝細胞肝ではこの代謝能は極めて低かった。

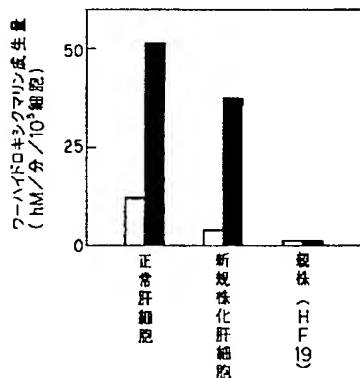
【0016】

【発明の効果】以上説明した様に、本発明による新規の株化肝細胞は高い薬物代謝活性を有しているため、体内に取り込まれた化学物質がどの様に変化するかを生体外で簡便に、再現性を良く調べることを可能にするものであり、薬物代謝試験や毒性、発癌性試験等の分野で動物実験の代替方法もしくは動物実験以前の一次スクリーニング方法として利用できるものである。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の実施例で得られた株化肝細胞のモノオキシゲナーゼ活性を調べるため、3-メチルコラントレンで刺激した細胞抽出液にNADP、グルコース6磷酸、グルコース6磷酸デヒドロゲナーゼ及び7-エトキシマリン（100μM）を加えて、37℃で反応させて7-ヒドロキシマリンの生成量を蛍光測定により定量したデータである。図2は、本発明の実施例で得られた株化肝細胞のモノオキシゲナーゼ活性を調べるため3-メチルコラントレンで刺激した培養細胞の培養液中に7-エトキシマリン（500μM）を加えて、培養液中に蓄積された代謝生成物である7-ヒドロキシマリンを蛍光測定により定量したデータである。図3は、図2と同様の実験を既存の肝細胞株を用いて行つた結果を示すデータである。

【図1】



【図2】

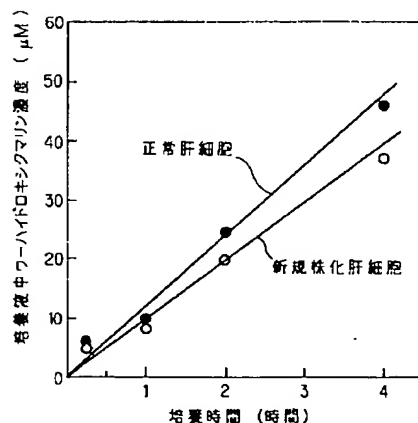


Figure 1 is a line graph showing the growth of four cell lines (MH1C1, H4TG, H4IE, and HTC) in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The Y-axis represents cell concentration in units of 10^4 cells/ml, ranging from 0 to 10. The X-axis represents culture time in days, ranging from 0 to 4. MH1C1 (solid circles) shows the highest growth, reaching approximately 8.5×10^4 cells/ml by day 4. H4TG (open circles) and H4IE (open triangles) show moderate growth, reaching approximately 1.0×10^4 cells/ml by day 4. HTC (solid triangles) shows the lowest growth, remaining near 0.5×10^4 cells/ml throughout the 4-day period.

Cell Line	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
MH1C1	0	4.5	6.5	7.5	8.5
H4TG (○)	0	0.5	0.5	0.8	1.0
H4IE (△)	0	0.2	0.5	0.5	1.0
HTC (▲)	0	0.2	0.2	0.5	0.5

【補正内容】

Cell Type	Control (nm/day/10 ⁴ cells)	7-β-Hydroxycoumarin (nm/day/10 ⁴ cells)
Normal liver cells	~12	~52
Differentiated liver cells	~5	~38
HIF-19 cells	~1	~1

Figure 1 is a line graph showing the concentration of 7-ethoxycoumarin in culture medium (μM) versus cultivation time (hours). The Y-axis is labeled "培養液中7-エトキシコウマリン濃度 (μM)" and ranges from 0 to 60. The X-axis is labeled "培養時間 (時間)" and ranges from 0 to 4. Two lines are plotted: a solid line with filled circles representing "正常肝細胞" (Normal liver cells) and a dashed line with open circles representing "新規株化肝細胞" (Newly established liver cells). Both lines show a linear increase in concentration over time, with the normal liver cells having a higher concentration than the newly established liver cells at all time points.

培養時間 (時間)	正常肝細胞 (μM)	新規株化肝細胞 (μM)
0	0	0
0.5	~5	~4
1.0	~10	~8
2.0	~25	~20
4.0	~48	~38

Figure 1 is a line graph showing the growth of various strains in a medium containing 7-α-globulin. The Y-axis is labeled '培養液中 7-α-グロブリン濃度 (μM)' (Concentration of 7-α-globulin in culture medium (μM)) and ranges from 0 to 10. The X-axis is labeled '培養時間 (時間)' (Cultivation time (hours)) and ranges from 0 to 4. Four strains are plotted: MHIC1 (solid circles), H4TG (open circles), H4IE (open triangles), and HTC (solid triangles). MHIC1 shows the highest growth, reaching approximately 8.5 μM at 4 hours. H4TG and H4IE show low growth, reaching about 1.0 μM at 4 hours. HTC shows no growth, remaining at 0 μM.

培養時間 (時間)	MHIC1 (μM)	H4TG (μM)	H4IE (μM)	HTC (μM)
0	0	0	0	0
0.5	2.5	0.2	0.1	0
1.0	4.5	0.5	0.3	0
2.0	6.5	0.8	0.5	0
3.0	8.0	1.0	0.8	0
4.0	8.5	1.0	1.0	0